Zur Wirkung verschiedener Phosphate und Polyphosphate auf das Skelett mehrerer Rattengenerationen

III F_2-Generation

Heinz Müssigmann

1962

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie
und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. h.c. K. Zipf

ZUR WIRKUNG VERSCHIEDENER PHOSPHATE UND POLYPHOSPHATE AUF DAS SKELETT MEHRERER RATTENGENERATIONEN

III F_2 - Generation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von

Heinz Müssigmann

aus

Peterzell Kreis Rottweil

München 1962

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. K. Ullrich

Referent: Prof. Dr. h.c. K. Zipf

Tag der mündlichen Prüfung: 27.2.1962

UNI-Druck, München 13, Amalienstraße 85

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
1. Allgemeiner Teil (Literatur)	2
1. 1) Chemie und Nomenklatur der kondensierten Phosphate	2
1. 2) Vorkommen und Physiologie kondensierter Phosphate in der Natur	2
1. 3) Verwendung kondensierter Phosphate in Lebensmitteln	3
1. 4) Das Verhalten der kondensierten Phosphate im Stoffwechsel	4
1. 5) Toxizität der kondensierten Phosphate	6
1. 6) Beeinflussung des Mineralhaushaltes durch kondensierte Phosphate	7
2. Eigene Untersuchungen	9
2. 1) Tiermaterial und Futter	9
2. 2) Knochenvorbereitung	10
2. 3) Calciumbestimmung	11
2. 3. 1) Prinzip	11
2. 3. 2) Reagenzien	11
2. 3. 3) Lösungen	11
2. 3. 4) Bestimmung	11
2. 3. 5) Berechnung	12
2. 4) Phosphat-Bestimmung	12
2. 4. 1) Prinzip	12
2. 4. 2) Reagenzien	12
2. 4. 3) Lösungen	12
2. 4. 4) Bestimmung	13
2. 4. 5) Berechnung	13

Seite

3. Ergebnisse 14

4. Diskussion 52

5. Zusammenfassung 53

6. Literaturverzeichnis 54

Lebenslauf 60

EINLEITUNG

Bei Vitamin D-Mangel läßt sich nach McCOLLUM eine Rachitis wachsender Ratten experimentell nur dann erzeugen, wenn Phosphat (oder Calcium) in großem Überschuß im Futter vorliegt. Diese Beobachung wird so erklärt, daß die Ratte auch ohne Vitamin D Calcium und Phosphat aus dem Darm aufnehmen kann, so daß das eine Ion erst durch Überschuß des anderen weitgehend unlöslich und damit nicht mehr resorbierbar gemacht werden muß (LEUTHARDT).

Daraus darf gefolgert werden, daß starke Phosphatzufuhr zu einer Verschlechterung der Calcium-Resorption mit den bekannten Folgen bei wachsenden und erwachsenen Tieren führen kann.

Um festzustellen, ob dieser Effekt auch durch Polyphosphate ausgelöst wird, wurden am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, Versuche an drei Rattengenerationen durchgeführt, von welchen ich die F_2-Generation zu untersuchen hatte. Es war festzustellen, ob Entwicklung, Mineralisierung des Skeletts und die Zusammensetzung der anorganischen Knochensubstanz hinsichtlich Calcium und Phosphat beeinflußt worden waren.

1. ALLGEMEINER TEIL

- Literatur -

1.1) Chemie und Nomenklatur der kondensierten Phosphate

Kondensierte Phosphate sind Verbindungen, die eine mehr oder minder große Zahl über Sauerstoffbrücken miteinander verbundener Phosphoratome enthalten. Nach ihrer Struktur teilt man sie in ringförmige Metaphosphate und kettenförmige, sowie über Sauerstoffbrücken vernetzte Polyphosphate ein. Nach THILO (53) handelt es sich um Verbindungen 5-wertigen Phosphors, welcher stets mit 4 Sauerstoffatomen abgesättigt ist, wobei das P-Atom im Mittelpunkt eines aus Sauerstoffatomen gebildeten Tetraeders steht. Die Polyphosphate genügen den Formeln $Me^{I}_{n+2}\left[P_nO_{3n+1}\right]$ oder $Me^{I}_{n}\left[H_2P_nO_{3n+1}\right]$ wobei n bis zu 10^6 betragen kann. Sie sind sowohl in der Lage, ihre Kationen gegen andere auszutauschen und dabei wie Ionenaustauscher zu wirken, als auch Hydrathüllen um sich zu bilden und dadurch eine große Menge Wasser zu binden.

1.2) Vorkommen und Physiologie kondensierter Phosphate in der Natur

Aus Untersuchungen von LOHMANN (41) und AKIRA (3) ist bekannt, daß die in der Hefe vorkommenden kondensierten Phosphate vorwiegend kettenförmige Polyphosphate darstellen, die sich zu 80 % in hochpolymere und zu 20 % in niederpolymere Verbindungen unterteilen lassen. Ihr physiologisches Verhalten wurde von McFARLANE (12) mit dem Ergebnis untersucht, daß der Gehalt an kondensierten Phosphaten bei einsetzender Gärung abnimmt, während gleichzeitig Zuckerphosphorsäureester gebildet werden. Die kondensierten Phosphate der Hefe dienen demnach als P-Reserve.

LANGE und LOHMANN (37) konnten in Versuchen mit radioaktiv markierten Phosphaten (^{32}P) eine Aufspaltung von hochpolymeren Phosphaten über niederpolymere Zwischenglieder zu Orthophosphat, sowie eine direkte Synthese von Polyphosphaten aus Orthophosphat feststellen. Außer in Hefe wurden kondensierte Phosphate von MANN (42) im Mycel des Aspergillus niger, von HOULAHAM und MITCHELL (27) in Neurospira, von ALBAUM, SCHATZ, HUNTER und HIRSCHFELD (1) in Euglena und von STIGH (52) in Acetabularia gefunden. In Corynebakterien wurden sie von EBEL (9), in Myco-

bakterien von RUSKA, BRINGSMANN, NECKEL und SCHUSTER (48) nachgewiesen. In höheren Organismen, sowie in tierischen Geweben, konnten bislang noch keine Polyphosphate festgestellt werden. Eine Ausnahme bilden die Larven der Wachsmotten Galleria und Achroea, deren Kot große Mengen spaltbares Phosphat enthält.

Enzyme, die auf die kondensierten Phosphate einwirken, sind in der belebten Natur weit verbreitet und vor allem für den Stoffwechsel von Mikroorganismen und Pflanzen von großer Bedeutung. KUNTZ (35) konnte aus Bäckerhefe kristallisierte Pyrophosphatase darstellen. Sie erwies sich als substratspezifisch. Der Nachweis der Substratspezifität anderer Poly- und Metaphosphatasen wurde von MATTENHEIMER (46) erbracht. Aus Untersuchungen von MALMGREN und INGELMANN (43) geht hervor, daß der Abbau von Poly- und Oligophosphaten zu Orthophosphat stufenweise erfolgt, wobei verschiedene Enzyme nacheinander wirksam werden. Der Abbau der Metaphosphate erfolgt durch spezifische Metaphosphatasen, die die Substrate zu den entsprechenden kettenförmigen Verbindungen hydrolysieren. Diese werden dann durch die Oligophosphatasen weiter abgebaut. Dieser Zyklus wurde von MATTENHEIMER (45) und KORNBERG (33) bestätigt.

Die Kenntnisse über eine enzymatische Biosynthese von Polyphosphaten sind jedoch noch sehr gering. In Escherichia coli fand KORNBERG (34) ein Enzym, das bei Anwesenheit von ATP im Stande ist, kondensiertes Phosphat aufzubauen.

1.3) Verwendung kondensierter Phosphate in Lebensmitteln

Bei der Herstellung von Schmelzkäse hat sich gezeigt, daß kondensierte Phosphate, besonders die Oligophosphate, anderen Schmelzsalzen überlegen sind. Man verwendet heute die Salze der Phosphorsäure (Ortho- Meta- und Polyphosphate) in einer Konzentration von höchstens 3,5 % der Rohware (§ 17, d. Verordn. über Käse d. Lebensm. Gesetzes). Die Schmelzsalze sollen das fettumhüllende Eiweiß lösen und das ausgetretene Fett in Emulsion bringen. Der Lösung des Eiweißes geht nach KOESTER (31) eine Quellung bzw. Hydratation voraus. Eine dispergierende Wirkung ist offenbar nur bei Salzen mit einwertigen Kationen und mehrwertigen Anionen gegeben, wenn diese gleichzeitig ein gutes Ca-Bindungsvermögen besitzen. Wie aus Arbeiten von HABICHT (23) hervorgeht, sind diese Vorgänge nur innerhalb eines engen pH-Bereiches möglich. Die Grundbedingungen für Schmelzsalze (Einwertigkeit des Kations, Mehrwertigkeit des Anions, gutes Calciumbindungsvermögen und gute Pufferkapazität) werden von den kondensierten Phosphaten

maximal erfüllt. Eine weitere Verwendung finden die Polyphosphate als Zusatz bei der Herstellung und Zubereitung diätetischer Lebensmittel und Erfrischungsgetränken.

Nach § 1 Abs. 2 der Verordnung über die Zulassung fremder Stoffe als Zusatz zu Lebensmitteln vom 19. Dezember 1959, sind Phosphatzusätze in Fleisch und Fleischerzeugnissen nicht mehr zulässig. An sich bewirkt ein Phosphatzusatz eine Quellung und vermehrte Fremdwasseraufnahme bei schlechtbindendem Fleisch und führt damit zu einer erhöhten Festigkeit und einer Aromaverbesserung des Bräts. GRAU (20) erklärt diesen Effekt mit einer Erhöhung der Salzkonzentration, einer Erhöhung des pH-Wertes und der Einwirkung der Salze auf die Erdalkaliionen des Muskels. Nach KOTTER (32) werden Polyphosphationen unter Zwischenschaltung von Mg-Ionen an Eiweiß adsorbiert. Die Folge ist eine Dissoziation des Aktomyosins in Aktin und Myosin und damit eine Extraktion des Eiweißes.

Seit etwa 20 Jahren werden Orthophosphate wegen ihrer guten Eisen- und Calcium-Bindung in der Trinkwasseraufbereitung verwendet. Die Zugabe an Orthophosphat bewegt sich bei 2mg P_2O_5/1 und soll 5 mg/1 nicht überschreiten. Über die allgemein zulässige Dosis an Phosphorsäure gehen die Ansichten von HAASE (22) und LAUERSEN (40) auseinander. Die für den menschlichen Organismus optimale tägliche Zufuhr an Phosphorsäure liegt nach LANG und RANKE (38) bei 2,3 g P_2O_5. Arbeiten von HONES (29), GÖTTE (18), EBEL (8) und MATTENHEIMER (44), bei denen im Vergleich zu den dem Wasser zugesetzten Mengen an Polyphosphaten mit erheblich höheren Dosen gearbeitet wurde, ergaben keinerlei nachteilige Folge für den lebenden Organismus.

An Polyphosphaten gelangen vorzugsweise GRAHAMSALZ und Natriumpolyphosphat wegen ihrer stabilisierenden Wirkung auf die Karbonathärte zur Anwendung. Nach AMMER (2) soll Natriumpolyphosphat gegenüber GRAHAMSALZ den Vorteil haben, daß es nicht hygroskopisch ist, nicht zur Klumpenbildung neigt und daher besser zu handhaben ist.

1.4) Das Verhalten der kondensierten Phosphate im Stoffwechsel

Bei intravenöser Verabreichung sollen die kondensierten Phosphate nach GÖTTE (18) in den Organen und dort vorwiegend im RES durch Adsorption derart gebunden werden, daß zwischen den Konzentrationen in Organen und Blut ein Gleichgewicht besteht. Die Elimination verläuft nach einem Exponentialge-

setz. Aus der Harndialyse ergibt sich, daß ein großer Teil zu Orthophosphat, das in den Stoffwechsel mit einbezogen werden kann, aufgespalten wird. Daneben enthält der Harn aber auch noch - wenn auch nur wenig - höher kondensierte Phosphate, die nicht dialysabel sind. Eine ausgedehnte Studie über die Ausscheidung kondensierter Phosphate liefert GOSSELIN (17). Sie zeigt, daß ringförmige Metaphosphate nach parenteraler Einverleibung praktisch quantitativ im Harn ausgeschieden werden. Doch weist die geringe Mehrausscheidung von Orthophoshat darauf hin, daß einige Prozente der injizierten Dosis abgebaut werden. Die intravenöse Injektion von linearen kondensierten Phosphaten führt zu einer prompten, starken Erhöhung der Orthophosphatausscheidung im Harn. Ein Teil der injizierten Polyphosphate wird jedoch nicht hydrolysiert. Die Spaltbarkeit der Polyphosphate im Organismus nimmt mit zunehmender Kettenlänge ab (GOSSELIN und MEGIRIAN (16)).

Nach peroraler Verabreichung werden andere Verhältnisse vorgefunden. Hier erwähnen alle Untersucher GÖTTE (18), LANG (39), GASSNER (14), SCHREIER und NÖLLER (50) eine nur geringe Resorbierbarkeit, die dadurch bedingt sei, daß die Zellmembran für die kondensierten Phosphate praktisch undurchlässig sei und die Substanzen im Magen-Darm-Trakt nur unvollkommen aufgespalten werden würden. Der Umfang der Spaltung bzw. Resorption ist stark vom Kondensationsgrad abhängig.

Eine geringe Resorbierbarkeit geht auch aus den Untersuchungen von GILLS (15) hervor, der feststellte, daß die Phosphate nur in geringem Umfang als P-Quelle von Hühnern verwertet werden.

Bei Beginn der Verfütterung von hochkondensiertem Natriumphosphat (KURROLSCHES SALZ) an Ratten, stellte GASSNER (14) eine sofortige Erhöhung der Orthophosphatausscheidung im Harn fest. Im Mittel wurden 25 % der verfütterten Tagesdosis als Orthophosphat im Harn ausgeschieden. Ähnliche Verhältnisse gibt derselbe Autor für GRAHAMSCHES Salz an, das bis zu 40 %, im Mittel 26 %, wieder im Harn erschien. Die Ausscheidung von kondensierten Phosphaten im Harn, sowohl beim KURROLSCHEN wie auch beim GRAHAMSCHEN Salz, begann erst nach einer Latenzzeit von 2 - 3 Tagen. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß eine Speicherung nach peroraler Gabe im Organismus nicht stattfindet.

Beim peroral verabreichten Trimetaphosphat an Ratten fanden GOSSELIN und Mitarbeiter (17) im Kot 20 - 55 % und im Harn 0,5 - 10 % der verfütterten Dosis unverändert wieder. Die Orthophosphatausscheidung wird mit 1 - 10 % der Tagesdosis angegeben und setzt im Gegensatz zu den linear kondensierten Phosphaten sofort ohne Latenzperiode ein.

Wenn Abbauprodukte der kondensierten Phosphate in das Zellinnere zu permeiern vermögen, wäre es denkbar, daß sie dort Phosphatasen kompetitiv zu hemmen vermögen. Tatsächlich ist es DIRHEIMER (7) gelungen, den Nachweis einer Hemmung der Hexokinase durch linear kondensierte Phosphate zu erbringen. Der Hemmeffekt ist der Kettenlänge proportional. Die zyklischen Metaphosphate sind in dieser Beziehung fast unwirksam. Der Hemmungseffekt beruht auf der komplexen Bindung von Mg^{++} und kann durch Erhöhung der Mg^{++} bzw. ATP Konzentration aufgehoben werden.

1.5) Toxizität der kondensierten Phosphate

Toxische Erscheinungen bei oraler Gabe kondensierter Phosphate treten nur bei sehr hohen Dosen auf. VAN ESCH (11) ermittelte die LD_{50} für Ratten bei peroraler Verfütterung eines Präparates, das zu 33 % aus KURROLSCHEM SALZ und zu 67 % aus einer Mischung von Tetranatrium- und Dinatriumpyrophosphat bestand, mit 4 g/kg Körpergewicht. Für Tetranatriumpyrophosphat lag die LD_{50} bei 4 - 5 g/kg. Beim Fütterungsversuch über drei Generationen Ratten mit 0; 0,5; 1,0; 2,5; und 5 % Phosphatzusatz gediehen die Tiere bis zu 2,5 % Phosphat im Futter normal. Bei 5 % Polyphosphatzusatz zeigte sich ein signifikant verlangsamtes Wachstum, eine geringe Fertilität und eine kürzere Lebensdauer. Dieselben Befunde wurden mit 5 % Orthophosphat erhoben. Das deutlichste Merkmal war eine Nierenschädigung. Bei 1 %iger Gabe von Ortho- bzw. kondensierten Phosphaten waren Calciuminkrustationen im interstitiellen Gewebe und lymphocytäre Infiltrationen festzustellen. Bei den mit 5 % Phosphat gefütterten Gruppen traten Schädigungen in Verbindung mit ausgedehnten tubulären Nekrosen und Degenerationserscheinungen auf. Außerdem enthielten die Aorten- und Magenwand einzelne Kalkdepots. Die Bestimmung des Calciumgehaltes des Blutserums zeigte im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikante Erniedrigung.

Die Erscheinungen bei intravenöser Applikation sind eingehend von GÖTTE, FRIMMER und PFLEGER (19) mit dem Ergebnis untersucht worden, daß hochmolekulare Phosphate kaum imstande sind, biologische, semipermeable Membranen, wie z.B. die Gefäßwand zu passieren, und daß die Polyphosphate durch die Aktivität des RES ziemlich rasch aus der Blutbahn eliminiert werden. Die Autoren fanden bei verschiedenen Versuchstieren als Vergiftungsbild hauptsächlich ein Kreislaufversagen durch diastolischen Herzstillstand sowie Lungenödem. HAHN, JAKOBI und RUMMEL (24) führten ebenfalls Fütterungsversuche an Ratten durch mit Phosphatzusätzen von

3 und 5 % Natriumpyrophosphat, 3 % Natriumtripolyphosphat und 3 und 5 % GRAHAMSALZ mit dem Ergebnis einer signifikanten Wachstumshemmung sowohl bei 5 % Pyrophosphat, als auch bei 5 % GRAHAMSALZ. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind mit denen von HODGE (26) weitgehendst identisch.

Die LD_{50} bei den von uns verfütterten Polyphosphaten wurde für Tetranatriumpyrophosphat mit 2,98-, für Natriumtripolyphosphat mit 3,21-, für Dinatriumpyrophosphat mit 2,65-, für Natriumhexametaphosphat mit 7,25-, für Carbamidoorthophosphat mit 5,84-, für Hexanatriumtetrapolyphosphat mit 3,92 und für Mononatriumorthophosphat mit 8,85 g/kg Körpergewicht ermittelt (55).

1.6) Beeinflussung des Mineralhaushaltes durch kondensierte Phosphate

Es wurde schon mehrfach erwähnt, daß kondensierte Phosphate eine Reihe von Kationen, z.B. Ca oder auch Mg, Fe, Cu etc. zu binden vermögen. Der Vorgang beruht auf einem Austausch dieser Ionen gegen die ursprünglich vorhandenen Alkalien und führt zur Bildung ziemlich stabiler Komplexe.

Es erhebt sich die Frage, ob auf diese Weise nicht lebenswichtige Metallionen im Magen-Darm-Trakt gebunden und so einer Resorption entzogen werden.

Zur Erörterung dieses Fragenkomplexes führte SCHWIETZER (51) Versuche mit 7 aus einem Wurf stammenden Hunden im Alter von 6 Monaten durch. Hier zeigte sich, daß selbst bei hoher Verfütterung von Polyphosphaten (GRAHAMSALZ) unter normalen Ernährungsbedingungen eine Beeinflussung des Eisenhaushaltes nicht stattfindet. Im Hinblick auf die Affinität der Polyphosphate zum Calcium wurde am Ende der Versuchsperiode bei allen Hunden eine Serumcalciumbestimmung durchgeführt. Die Werte lagen für Versuchs- und Kontrollhunde zwischen 9,5 und 10,5 mg % Ca und entsprachen somit der Norm.

Experimente am Menschen, von CORBIAN (6) ausgeführt, zeigen bei einer Aufnahme von 3 g Dinatriumphosphat keinen signifikant veränderten Blutphosphatgehalt. Auch JONES (30) konnte nach peroraler Verfütterung von 0,1 und 0,5 mg Dinatriumphosphat pro kg Körpergewicht nur einen vorübergehenden Anstieg des Blutphosphorgehaltes feststellen, der nach kurzer Zeit abrupt zur Norm abfiel. Anders liegen die Verhältnisse, wie SALVESEN (49) berichtet, wenn saure Phosphate (NaH_2PO_4) zur Anwendung gelangen.

Dabei steigt der Serumphosphatgehalt deutlich an, der Calciumgehalt bleibt unverändert. Dagegen rufen Orthophosphat-Lösungen (NaH_2PO_4+Na_2HPO_4 mit gleichem pH-Wert wie das Blut, einen deutlichen Anstieg des Phosphates und eine Verminderung des Calciumgehaltes hervor.

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1) Tiermaterial und Futter

Der Versuch wurde mit der dritten von drei gleichartig behandelten Generationen weißer Ratten durchgeführt, die in 14 Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe aufgeteilt war. Jede Versuchsgruppe bestand aus 10, die Kontrollgruppe aus 12 Tieren, jeweils die eine Hälfte waren männliche, die andere weibliche Ratten. Nach Art des Phosphatzusatzes waren die einzelnen Versuchsgruppen mit Farben gekennzeichnet, die wiederum entsprechend der Phosphatdosierung (1,8 bzw. 0,5 % der Trockensubstanz des Futters) in Gruppe I bzw. Gruppe II unterteilt waren.

Phosphat	Farbe	Gruppe	Dosierung d. Phosphats in % der Tr. Subst. d. Futters
Tetranatriumpyrophosphat	weiß	I u. II	1,8 und 0,5 %
Natriumtripolyphosphat	schwarz	"	" "
Dinatriumpyrophosphat	grün	"	" "
Na-hexametaphosphat	silber	"	" "
Carbamidoorthophosphat	schw. x	"	" "
Hexa-natr. tetrapolyphosphat	grün x	"	" "
Mononatrium-orthophosphat	ohne Farbe		" "
Kontrolltiere	rot	"	" "

Die Futterzusammensetzung war folgende:

Weizenschrot	1 Gewichtsteil
Haferflocken	1 "
Milchpulver	0,5 "
Trockenhefe	0,1 "
Salzmischung	0,1 "

Als Salzmischung wurde die von McCOLLUM und SIMMONDS (5) angegebene Zusammenstellung verwendet:

Calcium-lactat	130,0
$Ca\ (H_2PO_4)_{2x}\ H_2O$	54,0
K_2HPO_4	95,4
NaCl	17,3
$NaH_2PO_4xH_2O$	34,7
$MgSO_4$	26,6
Eisen-III citrat x $6H_2O$	11,8 Gewichtsteile

Die aufgeführten Bestandteile wurden vermischt, Wasser zugegeben und aufgekocht zu einem zähen Brei. Danach wurden, je nach Versuchsgruppe, die oben angegebenen Polyphosphate zugesetzt.

2700 g Substanz und 6750 g Wasser ergaben nach dem Kochen 8875 g Futterbrei. Das entspricht einer Trockensubstanz von $\frac{2700 \times 100}{8875} = 30\ \%$.

Bei den Ratten, die mit einem Anfangsgewicht von 60 - 80 g in den Versuch genommen wurden, ist jeweils im Abstand von 10 Tagen eine Gewichtskontrolle durchgeführt worden.

2.2) Knochenvorbereitung

Den mit Äther getöteten Ratten wurden die Hinterextremitäten abgetrennt und in alkalisch gemachtem Aqua dest. (NaOH) etwa 20 Min. gekocht. Danach konnten die Weichteile mit einer Handbürste von den Knochen entfernt werden. Nach gründlichem Abspülen (abwechselnd mit 0,01 nHCl und Aqua dest.) und 7-tägigem Trocknen bei 90 - 100 ^{o} C schloß sich eine trockene Veraschung bei 600 ^{o} C im Muffelofen an. Danach wurde die weiße Knochenasche pulverisiert.

2.3) Calcium-Bestimmung

2.3.1) Prinzip

Pulverisierte Knochenasche wurde in HCl gelöst, das Phosphat in azetatgepufferter Lösung mit $FeCl_3$ gefällt, im Filtrat vorliegendes Calcium durch Dinatriumäthylendiamintetraazetat komplex gebunden und der Umschlagspunkt durch den freies Calcium anzeigenden Indikator Murexid sichtbar gemacht.

2.3.2) Reagenzien: (p.a. Qualität)

Acid. acet. glac. (~99 % CH_3COOH, D_{20} 1,05)
0,01 n HCl
n HCl
Liquor ammon. caust. (~25 % NH_3, D_{20} 0,907)
Liquor ferri sesquichlor. (10 % Fe D_{20} 1,28) für chrom. Zwecke
0,01 n NH_4OH
n NH_4OH
n NaOH
0,1 n Komplexon III (Titriplex III® MERCK)
Murexid, 1 : 500 mit Na Cl gemischt.

2.3.3) Lösungen

1. Ammoniumazetatpuffer: 59,02 ml Acid. acet. glac. werden nach Verdünnen mit 38,9 ml. Liquor ammon. caust. versetzt, abgekühlt und mit Aqua dest. ad 1000 ml aufgefüllt. Der Puffer enthält (etwa) 1 mg Äquivalent CH_3COOH und 0,5 mg Äquivalent NH_4OH im Milliliter.
2. Eisenchlorid-Lösung wird durch Verdünnen von 72,7 ml Liquor ferri sesquichlorati mit aqua dest. ad 1000 ml bereitet. Sie enthält (etwa) 0,5 mg - Äquivalent $FeCl_3$ im Milliliter.

2.3.4) Bestimmung

Etwa 15 mg pulverisierte Knochenasche werden in einen 200 ml Erlenmeyerkolben gebracht, mit 1 ml m HCl versetzt und unter leichtem Umschwenken vollkommen gelöst. Nach Auffüllen ad 150 - 200 ml mit aqua dest., wird der pH-Wert mit 0,01 n NH_4OH auf 7,00 eingestellt. Danach wird tropfenweise und unter Umschwenken 1 ml $FeCl_3$-Lösung sowie 1 ml Puffer

zugesetzt. Nun wird kurz aufgekocht, abgekühlt auf 20 °C, auf 300 ml aufgefüllt und filtriert. 250 ml des Filtrats werden 5 ml m NaOH und bis zur kräftigen Rotfärbung Murexid zugegeben. Jetzt wird mit 0,1 m Komplexon III bis zum Umschlag nach purpur titriert.

2.3.5) Berechnung

1 ml 0,1 m Komplexon III ist 4,008 mg Calcium äquivalent.
Zur Berechnung dient die Formel

$$\text{Ca (\% d. Asche)} = \frac{\text{Komplexonverbrauch (ml) x 480,96}}{\text{Einwaage (in mg)}}$$

2.4) Phosphat-Bestimmung

2.4.1) Prinzip

Pulverisierte Knochenasche wird in HNO_3 gelöst, das Phosphat mit Ammonium molybdat gefällt und der Niederschlag mit NaOH in Lösung gebracht. Die überschüssige NaOH wird mit H_2SO_4 zurücktitriert.

2.4.2) Reagenzien: p.a. Qualität

Ammoniummolybdat krist.
Liquor ammon. caust. (25 % NH_3, D_{20} 0,907)
Ammoniumnitrat
Salpetersäure (34,4 % HNO_3, D_{20} 1,21)
Salpetersäure 1 %ig.
Kaliumnitratlösung 1 %ig.
0,1 n NaOH
0,1 n H_2SO_4
Phenolphthalein, 1 %ig in 70 %igem Äthanol
Methylorange 0,1 %ig in wässeriger Lösung.

2.4.3) Lösungen

75 g gepulvertes Ammoniummolybdat werden unter Erwärmen in 200 ml verd. Ammoniak (aus 165 ml Wasser und 35 ml Ammoniak [0,91]) gelöst. Hierzu fügt man eine Lösung von 150 Ammoniumnitrat in etwa 150 ml Wasser und füllt die Mischung auf ein Volumen von 500 ml auf. Die Gesamtlösung wird in dünnem Strahl unter Umrühren in 500 ml halbkonzentrierte Salpetersäure eingegossen. Nach Stehen über Nacht wird die Reagenzlösung filtriert.

2.4.4) Bestimmung

Etwa 10 mg pulverisierte Knochenasche werden - notfalls unter Erwärmen - in 5 ml 1 %iger Salpetersäure gelöst. Danach setzt man 10 ml aqua dest. hinzu und bringt die Lösung im Wasserbad auf 40 ^{o} C. Nach Zugabe von 5 ml Molybdatreagenz, läßt man 20 Min. absetzen und überführt den Niederschlag mit 1 %iger HNO_3 auf ein Glasfilter. Glas und Filter werden gegen Methylorange säurefrei gewaschen. Der Niederschlag von Phosphorammoniummolybdat wird in 20 ml 0,1 n NaOH gelöst und 2 Tropfen Phenolphthalein als Indikator zugesetzt. Die überschüssige NaOH wird mit 0,1 n H_2SO_4 zurücktitriert.

2.4.5) Berechnung

Die Berechnung des P-Gehaltes erfolgte nach der Formel:

$$P\ (\%\ \text{der Asche}) = \frac{(\text{vorgelegte Menge NaOH} - \text{verbr. Menge } H_2SO_4) \times 13{,}48}{\text{Einwaage (in mg)}}$$

3. ERGEBNISSE

Aus den Tabellen 1 - 30 ist der in der Knochenasche von Femur, Tibia und Fibula ermittelte Calcium- und Phosphorgehalt, die arithmetischen Mittelwerte, die Streuung s der Einzelbestimmungen sowie die Streuung m des arithmetischen Mittelwertes zu entnehmen. s wird nach der Formel

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - M)^2}{n - 1}} \qquad (54)$$

berechnet, wobei für x_i die Einzelbestimmung, für M der arithmetische Mittelwert und für n die Anzahl der Einzelbestimmungen zu setzen ist.

Der Ausdruck $m = \sqrt{\frac{s^2}{n}}$

stellt die mittlere Abweichung des Mittelwertes dar und ist ein Maß für seine Reproduzierbarkeit.

Tabelle 1

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe Weiß I

Tier Nr.	End-gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
1	252	1,1196	0,7653	37,9 38,1	18,5 18,2
2	260	1,0436	0,6791	38,0 37,8	17,8 17,8
3	208	0,9652	0,6118	37,7 37,9	18,6 18,7
4	248	1,1001	0,7306	37,9 38,0	18,5 18,2
5	222	1,0183	0,6843	38,0 38,2	18,5 18,6
M	238			37,95	18,34
s	---			± 0,135	± 0,326
m	± 10,2			± 0,043	± 0,103

Tabelle 2

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe Weiß I

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
6	336	1,0363	0,6318	37,9 38,2	18,6 18,3
7	356	1,4503	0,9689	38,0 37,8	18,8 18,6
8	342	1,4493	0,9599	37,7 37,9	17,8 18,0
9	370	1,5340	1,0139	38,1 38,3	18,6 18,4
10	363	1,3858	1,0322	37,7 37,9	17,8 18,2
M	355			37,96	18,31
s	---			± 0,218	± 0,266
m	± 8,4			± 0,068	± 0,084

Tabelle 3

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe Weiß II

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
21	214	1,0332	0,6987	37,8 38,1	18,4 18,3
22	241	1,3938	0,9653	37,9 38,3	18,4 18,5
23	250	1,1961	0,7966	37,8 37,9	18,3 18,4
24	254	1,0960	0,7547	38,0 38,2	18,3 18,5
25	255	1,1189	0,7069	37,8 38,0	18,5 18,4
M	243			37,98	18,40
s	---			± 0,164	± 0,127
m	± 8,1			± 0,052	± 0,040

Tabelle 4

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe Weiß II

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
26	321	1,3843	0,9225	37,9 37,7	18,4 18,3
27	316	1,4520	0,9625	37,7 37,9	18,2 18,0
28	319	1,2273	0,8454	38,1 38,3	18,5 18,3
29	336	1,2761	0,8675	37,9 37,7	18,2 18,3
30	das Tier fehlt		--	--	--
M	323			37,83	18,28
s	---			± 0,226	± 0,144
m	± 5,3			± 0,08	± 0,051

Tabelle 5

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe Schwarz I

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
MK	335	1,4944	0,9787	37,8 37,7	18,5 18,6
MR	346	1,7652	1,1969	37,8 37,5	18,5 18,5
MS	377	1,9000	1,3001	37,8 37,9	18,6 18,5
MSR	384	1,5431	1,0885	38,1 37,8	18,5 18,5
M ohne	387	1,6525	1,1001	37,8 38,0	18,4 18,4
M	366			37,82	18,50
s	---			± 0,136	± 0,067
m	± 10,4			± 0,045	± 0,021

Tabelle 6

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe Schwarz I

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
WS	262	1,1493	0,7434	37,9 37,7	18,6 18,4
WK	246	1,1054	0,7350	37,7 37,9	18,3 18,4
WR	263	1,0688	0,6771	38,1 37,8	18,4 18,6
WRS	258	1,1471	0,7454	37,7 38,0	18,5 18,7
W ohne	277	1,1662	0,7823	38,2 37,9	18,4 18,6
M	261			37,89	18,49
s	---			± 0,166	± 0,128
m	± 4			± 0,053	± 0,047

Tabelle 7

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe Schwarz II

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
256	423	1,7129	1,1361	38,3 38,0	18,7 18,6
257	418	1,4580	0,9750	38,0 38,3	18,8 18,7
258	470	1,7250	1,0787	38,3 38,1	18,7 18,5
259	364	1,2666	0,8338	37,8 37,9	18,8 18,5
260	342	1,0536	0,6902	38,0 38,2	18,6 18,6
M	403			38,09	18,65
s	---			± 0,176	± 0,108
m	± 22,2			± 0,056	± 0,034

Tabelle 8

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe Schwarz II

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
251	294	1,2476	0,8422	38,0 38,3	18,8 18,6
252	255	1,1560	0,7560	38,2 38,0	18,5 18,6
253	266	1,0206	0,6856	38,3 38,1	18,3 18,5
254	233	1,0657	0,7041	38,0 37,9	18,2 18,5
255	236	1,0177	0,6719	37,8 38,0	18,4 18,6
M	257			38,06	18,50
s	---			± 0,164	± 0,017
m	± 11,6			± 0,052	± 0,054

Tabelle 9

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe Grün I

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
226	318	1,1406	0,7180	37,7 37,9	18,6 18,4
227	318	1,2698	0,8108	38,3 38,0	18,3 18,5
228	323	1,5310	0,9360	37,9 38,2	18,4 18,6
229	381	1,4770	0,9601	38,2 37,9	18,3 18,4
230	354	1,2176	0,7725	38,2 38,0	18,3 18,5
M	343			38,03	18,43
s	---			± 0,168	± 0,102
m	± 10			± 0,053	± 0,032

Tabelle 10

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe Grün I

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
221	217	1,0492	0,6593	37,8 38,1	18,4 18,5
222	259	1,2072	0,7675	38,0 37,8	18,6 18,5
223	239	1,3825	0,8763	37,7 38,0	18,5 18,4
224	254	1,2078	0,8021	38,1 38,0	18,5 18,7
225	277	1,0594	0,6714	37,7 37,9	18,4 18,6
M	249			37,91	18,51
s	---			± 0,152	± 0,100
m	± 10,1			± 0,048	± 0,032

Tabelle 11

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe Grün II

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
61	385	1,4087	0,8587	37,9 38,1	18,6 18,4
62	313	1,0403	0,6807	38,2 38,1	18,4 18,7
63	407	1,4623	0,9352	37,6 37,8	18,4 18,7
64	408	1,5085	0,9361	37,9 38,3	18,6 18,4
65	338	1,3056	0,8319	38,0 38,1	18,4 18,5
M	370			38,0	18,51
s	---			± 0,206	± 0,128
m	± 17,8			± 0,065	± 0,041

Tabelle 12

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe Grün II

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
66	187	0,8981	0,5800	38,3 38,0	18,5 18,7
67	226	0,9216	0,6134	38,2 38,0	18,5 18,3
68	212	0,8850	0,5830	37,7 37,8	18,4 18,2
69	186	0,7325	0,4631	38,0 37,8	18,4 18,6
70	237	1,1747	0,7728	37,9 37,8	18,6 18,4
M	226			37,95	18,46
s	---			± 0,202	± 0,151
m	± 13,3			± 0,064	± 0,048

Tabelle 13

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe Silber I

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
286	321	1,2988	0,8446	37,9 38,1	18,6 18,7
287	360	1,3346	0,8818	37,9 38,1	18,3 18,5
288	378	1,3070	0,8653	37,9 38,2	18,4 18,6
289	404	1,5784	1,0114	38,1 38,0	18,7 18,5
290	327	1,2037	0,7542	37,7 37,9	18,5 18,4
M	340			37,98	18,52
s	---			± 0,148	± 0,138
m	± 17,6			± 0,047	± 0,044

Tabelle 14

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe Silber I

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
281	266	1,0212	0,6503	37,8 38,0	18,5 18,3
282	287	1,1544	0,7648	37,9 38,2	18,3 18,6
283	242	1,0386	0,6735	37,9 38,0	18,3 18,5
284	268	1,0394	0,6721	37,6 37,7	18,6 18,4
285	247	0,8393	0,5516	38,2 38,3	18,8 18,6
M	262			37,96	18,49
s	---			± 0,230	± 0,166
m	± 8,1			± 0,073	± 0,053

Tabelle 15

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe Silber II

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
236	352	1,4258	0,9079	38,1 37,9	18,6 18,3
237	367	1,2995	0,8300	38,0 38,1	18,8 18,6
238	323	1,2802	0,8033	37,9 38,2	18,5 18,6
239	315	1,2630	0,7812	38,2 38,3	18,7 18,5
240	317	1,1206	0,7401	38,2 38,0	18,4 18,3
M	335			38,09	18,53
s	---			± 0,147	± 0,163
m	± 10,3			± 0,047	± 0,052

Tabelle 16

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe Silber II

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
231	234	0,9067	0,5980	38,0 38,3	18,4 18,6
232	246	0,9880	0,6537	38,0 38,3	18,3 18,5
233	222	0,8984	0,5779	38,1 38,3	18,3 18,5
234	247	1,0334	0,6837	37,9 38,2	18,5 18,3
235	225	1,0017	0,6624	38,0 38,3	18,2 18,4
M	235			38,14	18,41
s	---			± 0,158	± 0,125
m	± 5,2			± 0,05	± 0,0395

Tabelle 17

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe Schwarz x I

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
246	333	1,4180	0,8965	37,8 38,1	18,3 18,5
247	346	1,1543	0,7623	38,0 38,2	18,4 18,7
248	420	1,4686	0,9511	37,8 37,9	18,1 18,5
249	341	1,3786	0,8917	37,9 38,2	18,4 18,7
250	330	1,3642	0,8703	38,0 37,8	18,4 18,3
M	334			37,96	18,43
s	---			± 0,157	± 0,188
m	± 4,5			± 0,0495	± 0,0594

Tabelle 18

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe Schwarz x I

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
241	230	1,0639	0,7027	38,3 38,1	18,5 18,6
242	247	1,1096	0,7865	37,7 37,9	18,6 18,7
243	224	0,9712	0,6501	38,0 38,2	18,6 18,5
244	209	0,9724	0,6377	37,9 38,2	18,4 18,6
245	222	1,0326	0,6806	37,8 38,0	18,6 18,3
M	226			38,01	18,54
s	---			± 0,191	± 0,117
m	± 6,2			± 0,0605	± 0,037

Tabelle 19

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe Schwarz x II

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
266	366	1,3231	0,8646	37,6 37,7	18,8 18,6
267	366	1,3346	0,8703	38,0 38,2	18,6 18,4
268	377	1,4145	0,9504	37,7 37,8	18,5 18,5
269	352	1,1604	0,7805	37,7 37,9	18,4 18,6
270	383	1,5575	1,0156	37,8 37,8	18,6 18,5
M	369			37,82	18,55
s	---			± 0,178	± 0,118
m	± 4,3			± 0,056	± 0,037

Tabelle 20

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe Schwarz x II

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
261	213	0,9382	0,6354	38,0 38,2	18,6 18,7
262	233	0,9436	0,6058	37,9 38,0	18,4 18,6
263	232	0,9379	0,6127	37,9 38,1	18,6 18,8
264	250	1,0745	0,6984	38,2 37,9	18,4 18,7
265	216	0,9640	0,6387	38,1 38,2	18,2 18,5
M	233			38,05	18,55
s	---			± 0,127	± 0,178
m	± 7,0			± 0,040	± 0,056

Tabelle 21

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe Grün I

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
96	365	1,9479	1,2803	37,8 37,9	18,6 18,4
97	373	1,3374	0,9024	38,2 38,0	18,7 18,4
98	397	1,4427	0,9622	37,9 37,8	18,3 18,6
99	348	1,3207	0,8595	38,2 38,0	18,3 18,6
100	376	1,6216	1,0523	36,9 37,1	18,5 18,7
M	371			37,78	18,51
s	---			± 0,435	± 0,153
m	± 8,5			± 0,137	± 0,048

Tabelle 22

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe Grün x I

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
91	255	0,9205	0,6021	38,2 38,0	18,6 18,7
92	249	0,9418	0,6331	38,0 38,2	18,7 18,5
93	233	1,1785	0,7697	38,0 37,9	18,8 18,5
94	294	1,3040	0,8799	38,3 38,1	18,6 18,3
95	230	1,0002	0,6587	38,1 38,0	18,6 18,7
M	252			38,08	18,60
s	---			± 0,118	± 0,015
m	± 11,7			± 0,0375	± 0,005

Tabelle 23

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe Grün x II

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
166	343	1,3278	0,8758	37,7 37,9	18,0 18,2
167	322	1,3219	0,9023	38,1 37,8	18,3 18,2
168	319	1,2132	0,7974	38,2 38,0	18,2 18,5
169	296	1,2362	0,8482	38,3 38,2	18,4 18,3
170	333	1,1917	0,8008	37,7 37,9	18,3 18,5
M	323			37,98	18,29
s	---			± 0,216	± 0,165
m	± 8,3			± 0,068	± 0,052

Tabelle 24

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe Grün x II

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
161	215	0,8520	0,5478	37,9 37,7	18,2 18,5
162	250	1,0870	0,7348	38,0 38,0	18,3 18,4
163	220	0,8721	0,5726	38,4 38,2	18,2 18,5
164	255	0,9701	0,6440	37,9 37,7	18,2 18,6
165	245	0,9610	0,6318	37,7 38,0	18,4 18,5
M	237			37,95	18,38
s	---			± 0,217	± 0,150
m	± 8,2			± 0,069	± 0,0475

Tabelle 25

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe ohne Farbe I

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
276	320	1,2334	0,7872	38,3 38,0	18,2 18,5
277	360	1,5318	1,0002	37,7 37,9	18,2 18,4
278	320	1,3039	0,8355	38,3 38,0	18,5 18,6
279	355	1,4757	0,9633	37,9 38,1	18,4 18,6
280	370	1,5688	1,0131	37,9 38,1	18,5 18,7
M	345			38,02	18,46
s	---			± 0,193	± 0,165
m	± 10,9			± 0,061	± 0,052

Tabelle 26

Ca- und P-Gehalt der Knocheasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe ohne Farbe I

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
271	201	1,0547	0,6898	37,6 37,5	18,7 18,4
272	244	1,2483	0,8103	38,3 38,0	18,7 18,6
273	244	0,9580	0,6421	38,0 38,2	18,8 18,4
274	229	0,9432	0,6075	38,2 38,0	18,6 18,4
275	235	0,9633	0,6482	37,9 38,0	18,4 18,6
M	231			37,97	18,56
s	---			± 0,254	± 0,140
m	± 8,0			± 0,0805	± 0,044

Tabelle 27

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe ohne Farbe II

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
46	366	1,5538	1,0495	38,0 38,1	18,7 18,4
47	332	0,9910	0,6639 (ein Femur fehlt)	38,2 37,9	18,5 18,3
48	314	1,1353	0,7364	38,0 37,8	18,3 18,2
49	370	1,5503	1,0003	38,0 38,3	18,7 18,5
50	386	1,1813	0,7935	38,2 38,0	18,6 18,4
M	354			38,05	18,46
s	---			± 0,151	± 0,171
m	± 13,2			± 0,048	± 0,054

Tabelle 28

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe ohne Farbe II

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
41	246	1,0430	0,7126	37,8 37,9	18,6 18,7
42	300	1,0678	0,7228	37,8 38,0	18,3 18,5
43	286	1,3334	0,9077	38,0 37,9	18,5 18,4
44	240	1,0172	0,7077	38,1 37,8	18,7 18,4
45	252	1,0368	0,6054	38,1 37,8	18,3 18,6
M	245			37,92	18,50
s	---			± 0,165	± 0,150
m	± 15,5			± 0,052	± 0,047

Tabelle 29

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 männlichen Versuchsratten der Gruppe Rot "Kontrolltiere"

Tier-Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
296	344	2,07864	1,3277	38,0 37,9	18,5 18,8
297	340	1,6363	1,0394	37,8 38,1	18,5 18,8
298	371	1,2207	0,7897	38,0 38,3	18,2 18,5
299	335	1,6588	1,1475	37,8 38,0	18,3 18,6
300	das Tier fehlt		--	--	--
M	349			37,98	18,52
s	---			± 0,16	± 0,212
m	± 8,1			± 0,057	± 0,075

Tabelle 30

Ca- und P-Gehalt der Knochenasche von 5 weiblichen Versuchsratten der Gruppe Rot "Kontrolltiere"

Tier Nr.	Gewicht (g)	Knochengew. n. Wasserentzug (g)	Aschegew. (g)	Ca-Gehalt der Asche (%)	P-Gehalt der Asche (%)
291	232	0,8020	0,5449	37,8 38,0	18,5 18,8
292	211	0,9779	0,6374	37,9 38,2	18,4 18,6
293	259	1,0243	0,6722	37,8 38,1	18,8 18,5
294	das Tier fehlt		--	--	--
295	das Tier fehlt		--	--	--
M	250			37,97	18,6
s	---			± 0,157	± 0,167
m	± 19,7			± 0,064	± 0,068

Aus den Tabellen ist zu ersehen, daß zwischen den bei Kontroll- und Versuchsgruppen ermittelten Werten für Calcium und Phosphor nur geringe Differenzen bestehen. Durch eine Signifikanzprüfung nach der Formel

$$\pm T \sqrt{m_1^2 + m_2^2} \qquad (54)$$

mit einer Wahrscheinlichkeit von 98 % soll entschieden werden, ob die Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen zufällig oder statistisch gesichert sind. T ist ein vom zahlenmäßigen Umfang der zu verglichenden Meßreihen abhängiger, den Wahrscheinlichkeitsgrad bestimmender Faktor; m_1 und m_2 sind die mittleren Abweichungen der Mittelwerte der zu vergleichenden Versuchs- und Kontrollgruppen. Signifikanz besteht dann, wenn die Differenz der vergleichbaren Mittelwerte zahlenmäßig größer ist, als der den Zufallsbereich angebende Wurzelausdruck.

Die nächsten 2 Tabellen stellen die Ergebnisse dieser Prüfung auf statistische Haltbarkeit der Unterschiede der Calcium- bzw. Phosphor-Gehalte zwischen Versuchs- und Kontrolltieren dar.

Tabelle 31

Prüfung der Calcium-Gehalte männlicher und weiblicher Tiere auf Signifikanz (Wahrscheinlichkeit 98 %)

Tiergruppe	Differenz zwischen Kontroll- u. Versuchsgruppen (männlich)	Zufallsbereich (männlich)	Differenz zwischen Kontroll-u. Versuchsgruppen (weiblich)	Zufallsbereich (weiblich)
weiß I	0,02	0,222	0,02	0,202
weiß II	0,15	0,255	0,01	0,214
schwarz I	0,15	0,182	0,08	0,216
schwarz II	0,11	0,199	0,09	0,214
grün I	0,05	0,202	0,06	0,208
grün II	0,02	0,216	0,02	0,236
silber I	0,00	0,185	0,01	0,251
silber II	0,11	0,185	0,17	0,212
schwarz x I	0,02	0,189	0,04	0,228
schwarz x II	0,16	0,200	0,08	0,197
grün x I	0,20	0,372	0,11	0,194
grün x II	0,00	0,222	0,02	0,245
ohne Farbe I	o,04	0,209	0,00	0,267
ohne Farbe II	0,07	0,182	0,05	0,214

Tabelle 32

Prüfung der Phosphor-Gehalte männlicher und weiblicher Tiere auf Signifikanz (Wahrscheinlichkeit 98 %)

Tiergruppe	Differenz d. Mittelwerte (männlich)	Zufallsbereich (männlich)	Differenz d. Mittelwerte (weiblich)	Zufallsbereich (weiblich)
weiß I	0,21	0,280	0,26	0,314
weiß II	0,24	0,256	0,20	0,205
schwarz I	0,02	0,195	0,11	0,214
schwarz II	0,13	0,205	0,10	0,225
grün I	0,09	0,204	0,09	0,195
grün II	0,01	0,214	0,14	0,216
silber I	0,00	0,217	0,11	0,224
silber II	0,01	0,228	0,19	0,204
schwarz x I	0,03	0,239	0,06	0,201
schwarz x II	0,03	0,209	0,05	0,229
grün x I	0,01	0,222	0,00	0,182
grün x II	0,23	0,230	0,22	0,225
ohne Farbe I	0,06	0,230	0,04	0,210
ohne Farbe II	0,06	0,232	0,10	0,225

Tabelle 33

Ca/P-Verhältnis in der Knochenasche

Tiergruppe	männlich	weiblich
weiß I	2,06	2,06
weiß II	2,06	2,05
schwarz I	2,04	2,04
schwarz II	2,04	2,04
grün I	2,06	2,05
grün II	2,05	2,05
silber I	2,06	2,05
silber II	2,05	2,06
schwarz x I	2,05	2,05
schwarz x II	2,04	2,05
grün x I	2,04	2,04
grün x II	2,06	2,06
ohne Farbe I	2,05	2,05
ohne Farbe II	2,06	2,05
Kontrollgruppe	2,05	2,04

Um einen Hinweis auf den Mineralisierungsgrad des Skelettes zu erhalten, wurde an Hand der Trocken- und Aschegewichte der prozentuale Aschegehalt von Femur, Tibia und Fibula berechnet. In Tabelle 34 sind die dabei gefundenen Mittelwerte mit ihrer Abweichung ($s / \sqrt{n}$) zusammengestellt.

Prozentualer Aschegehalt von Femur, Tibia und Fibula bezogen auf den wasserfreien Gesamtknochen

Tabelle 34

Prozentualer Aschegehalt

Tiergruppe	männlich	weiblich
weiß I	66,88 ± 2,15	66,24 ± 0,85
weiß II	67,50 ± 0,635	67,94 ± 0,99
schwarz I	67,64 ± 0,80	65,48 ± 0,81
schwarz II	65,64 ± 0,855	66,58 ± 0,43
grün I	63,62 ± 0,70	64,36 ± 0,635
grün II	63,34 ± 0,77	65,62 ± 0,55
silber I	65,40 ± 0,70	65,52 ± 0,45
silber II	63,86 ± 0,75	66,16 ± 0,256
schwarz x I	65,00 ± 0,50	67,52 ± 0,87
schwarz x II	66,52 ± 0,455	66,30 ± 0,56
grün x I	66,40 ± 0,72	66,66 ± 0,34
grün x II	67,30 ± 0,57	66,06 ± 0,61
ohne Farbe I	64,90 ± 0,31	65,96 ± 0,57
ohne Farbe II	66,18 ± 0,59	66,78 ± 1,91
Kontrollgruppe	65,40 ± 1,31	66,30 ± 0,88

Eine Signifikanzprüfung ergibt, daß die Mineralisierung des Skeletts der Versuchsgruppen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % weder besser noch schlechter ist als bei der Kontrollgruppe.

Die errechneten Werte sind aus Tabelle 35 ersichtlich.

Tabelle 35

Prüfung der Mineralisierung des Skeletts zwischen Versuchs- und Kontrolltieren auf Signifikanz (Wahrscheinlichkeit 95 %)

Tiergruppe	Differenz der Mittelwerte zw. Kontroll-u. Versuchsgruppen (männlich)	Zufalls-bereich (männlich)	Differenz der Mittelwerte zw. Kontroll-u. Versuchsgruppen (weiblich)	Zufalls-bereich (weiblich)
weiß I	1,48	6,03	0,06	2,93
weiß II	2,1	3,48	1,64	3,19
schwarz I	2,24	3,66	0,82	2,86
schwarz II	0,24	3,73	0,28	2,36
grün I	1,78	3,56	1,94	2,59
grün II	2,06	3,64	0,68	2,48
silber I	0,00	3,56	0,78	2,38
silber II	1,54	3,61	0,14	2,19
schwarz x I	0,40	3,35	1,22	2,96
schwarz x II	1,12	3,31	0,00	2,50
grün x I	1,00	3,60	0,36	2,26
grün x II	1,9	3,41	0,24	2,62
ohne Farbe I	0,5	3,14	0,34	2,51
ohne Farbe II	0,78	3,44	0,48	5,08

Um zu prüfen, ob durch die Phosphatzufütterung eine Wachstumshemmung eintritt, wurden die in Tabelle 1 - 28 angegebenen Endgewicht der Testgruppen mit den in Tabelle 29 aufgeführten Gewichten der Kontrollgruppe verglichen und statistisch ausgewertet. (Wegen Trächtigkeit der weiblichen Tiere kamen dafür nur die männlichen in Betracht). Über das Ergebnis gibt Tabelle 36 Aufschluß.

Tabelle 36

Statistische Auswertung der Endgewichtsdifferenzen zwischen Kontrollgruppe und Testgruppe (Überschreitungswahrscheinlichkeit des Zufallsbereiches 1 %)

	1,8 % Polyphosphat-zusatz		0,5 % Polyphosphat-zusatz	
Tiergruppen	Mittelwerts-differenz	Zufalls-bereich	Mittelwerts-differenz	Zufalls-bereich
weiß	6	39,6	26	33,2
schwarz	17	44,8	54	79,9
grün	6	45,0	21	68,6
silber	9	68,2	15	45,1
schwarz x	15	31,2	20	31,5
grün x	22	39,6	26	40,0
ohne Farbe	4	47,6	5	53,4

Wie die Tabelle zeigt, ergeben sich auch zwischen den Endgewichten der Kontroll- und Versuchstiere keine statistisch haltbaren Unterschiede.

Man kann also mit Sicherheit annehmen, daß die Zufütterung der aufgeführten Polyphosphate in angegebener Dosierung (0,5 bzw. 1,8 %) keinerlei Einfluß auf das Knochengerüst der Ratte hat.

4. DISKUSSION

Aus Fütterungsversuchen von HAHN (24) ist bekannt, daß Polyphosphate je nach der Konzentration zu einer vorübergehenden bzw. andauernden Wachstumshemmung führen können. Dies scheint von der Konzentration im Futter und nicht von der Art der Polyphosphate (24) abhängig zu sein. Die eine signifikante Wachstumshemmung hervorrufende Konzentration liegt zwischen 2,5 und 3 %.

Mit diesen Angaben befinden sich die eigenen Befunde in Übereinstimmung. Wie Tabelle 36 zeigt, bestehen zwischen den Endgewichten der Tiere der Kontrollgruppe und den mit Phosphat gefütterten Tieren der Testgruppen keine sicheren Unterschiede. Die durch die "Ionenaustauscher-Eigenschaft" der Polyphosphate denkbare "Demineralisierung" des Skeletts wird durch die in Tabelle 35 zusammengestellten Befunde ausgeschlossen, da eine Abnahme des prozentualen Aschegehaltes von Femur, Tibia und Fibula nicht vorliegt. Ähnliche Untersuchungen sind aus der Literatur nicht bekannt.

Der in der Tabelle 33 aufgeführte Ca/P-Quotient, der konstant um 2,0 liegt, stimmt mit entsprechenden Literaturangaben (4, 28, 36) überein und kann als physiologisch bezeichnet werden.

Die negativ ausgefallene Signifikanzprüfung des Calcium- und Phosphorgehaltes der Asche; dargestellt in den Tabellen 31 und 32, stimmt mit den Versuchen von HAHN, JAKOBI und SEIFEN (25) überein. Auch sie fanden nach Verfütterung von Polyphosphaten in der Gesamtasche ihrer Versuchstiere keine veränderten Verhältnisse. In weitgehender Übereinstimmung befinden sich die ermittelten Calciumgehalte auch mit den bei FLASCHENTRÄGER (13) und MORGULIS (47) angegebenen Werten:

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die von uns verfütterten Polyphosphate in den angewendeten Konzentrationen, weder zu einer Wachstumshemmung noch zu einer Beeinflussung der Mineralisierung des Skeletts, noch zu einem unphysiologischen Ca/P-Quotienten geführt haben. Aus diesen Gründen kann man sie im Hinblick auf ihre Wirkung am Rattenskelett, auch bei Verabreichung über 3 Generationen als unschädlich betrachten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Der dritten von drei gleichartig behandelten Rattengenerationen wurden Ortho- bzw. Polyphosphatzusätze von 0,5 und 1,8 % zum Grundfutter verabreicht.

2. Es kamen zur Anwendung:

   Mononatriumorthophosphat
   Carbamidoorthophosphat
   Dinatriumpyrophosphat
   Tetranatriumpyrophosphat
   Natriumtripolyphosphat
   Hexanatriumtetrapolyphosphat
   Natriumhexametaphosphat.

3. Das Wachstum wurde durch die Zusätze nicht beeinflußt.

4. Durch die Phosphate wurde die Mineralisierung des Skeletts nicht gestört.

5. Der Ca/P-Quotient der Knochen war physiologisch. Er lag bei Versuchs- und Kontrolltieren um 2,0.

6. Die Calcium- und Phosporgehalte in der Knochenasche waren zwischen Versuchs- und Kontrolltieren nicht verschieden.

7. Die geprüften Polyphosphate haben in den angegebenen Konzentrationen auch bei Verabreichung über 3 Rattengenerationen keinen schädigenden Einfluß auf das Skelett.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALBAUM, H.G., A. SCHATZ and S.H. HUNTER: Arch. Bioch. 29, 210 (1950)

2. AMMER, G.: Wasser 18, 128 (1949)

3. ARIKA, YOSHIDA: J. Biochem. 42, 381 (1955)

4. BRONSCH, K.: Tierärztl. Umschau 11, 386 (1956)

5. McCOLLUM, E.V. and N. SIMMONDS: J. Biol. Chem. 33, 55 (1918)

6. CORBIAN, L.: Compt. rend. de la Société de Biol. 122, 474 (1936)

7. DIRRHEIMER, G. und J.P. EBEL: Bull. Soc. chim. biol. (Paris) 38, 1337 (1956)

8. EBEL, J.P.: Bull. Soc. chim. biol. 34, 321 (1952)

9. EBEL, J.P. Compt. r. Acad. Sci. (Paris) 228, 1312 (1949)

10. EBEL, J.P., J. COLAS, N. BUSCH: Bull. Soc. chim. France 1955, 1087 - 1093

11. ESCH, G.J. van, H.H. VINK, S.J. WIT und H. van GENDEREN: Arzneimittel-Forschung 7, 172 (1957)

12. McFARLANE, M. — Biochem. J. 30, 1369 (1930)

13. FLASCHENTRÄGER, B. und E. LEHNARTZ: — "Physiolog. Chemie" Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1954

14. GASSNER, K., W. KIECKEBUSCH und K. LANG: — Biochem. Z. 328, 485 (1957)

15. GILIS, M.B., L.C. NORRIS and G.F. HEUSER: — J. Nutrit. 52, 114 (1954)

16. GOSSELIN, R.E. and R. MEGIRIAN: — J. Pharmacol. a. Exper. Ther. 115, 402 (1955)

17. GOSSELIN, R.E., A. ROTHSTEIN, G.J. MILLER and H.L. BERKE: — J. Pharmacol. a. Exper. Ther. 106, 180 (1952)

18. GÖTTE, H.: — Naturforschung 8 b, 173 (1953)

19. GÖTTE, H. und M. FRIMMER und K. PFLEGER — Angew. Chem. 65, 52 (1953)

20. GRAU, R.: — Beil. Münch. Tierärztl. Wschr. 66, 335 (1953)

21. GRIEBEL, G.: — Pharmaz. Zentralh. 95, 296 (1956)

22. HAASE, W.: — Gesundh. Ing. 73, 404 (1952)

23. HABICHT, L.: Milchw. Forsch. 16, 347 (1934)

24. HAHN, F., H. JACOBI und W. RUMMEL: Naturwiss. 43, 539 (1956)

25. HAHN, F., J. JACOBI und E. SEIFEN: Arzneimittel-Forschung. 5, 286 (1958)

26. HODGE, H.C.: "Kondensierte Phosphate in Lebensmitteln" Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1956

27. HOULAHAM, M.B. and H.K. MITCHELL: Arch. Biochem. 19, 257 (1948)

28. HOWLAND, J.W., K. MARRION and K. KRAMER: J. Biol. Chem. 68, 721 (1926)

29. JONES, K.K.: Amer. Water Works Assoc. 32, 1471 (1940)

30. JONES, H.J. and M. RAPOPORT: J. Biol. Chem. 93, 153 (1931)

31. KOESTER, G.: "Schweiz. Milchwirtschaft" Verlags-Aktiengesellschaft Thun 1948

32. KOTTER, L.: "Zur Wirkung kondensierter Phosphate und anderer Salze auf tierisches Eiweiß". Hannover: Verlag M. u. H. Schaper 1960

33. KORNBERG, S.R. J. Biol. Chem. 218, 23 (1956)

34. KORNBERG, A., S.R. KORNBERG und E.S. SIMMES: Biochem. Biophys. Acta 20, 215 (1956)

35. KUNITZ, E.: J. Gen. Physiol. 35, 423 (1952)

36. LANG, K.: Regensb. Jahrb. ärztl. Fortb. 5, 189 (1956)

37. LANGE, P. und K. LOHMANN: Biochem. Z. 328, 1 (1956)

38. LANG, K. und C.F. RANKE: "Stoffwechsel und Ernährung" Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1950

39. LANG, K., L. SCHACHINGER, O. KARGES, F.K. BLUMENBERG, G. ROSSMÜLLER und K. SCHMUTTE: Biochem. Z. 327, 118 (1955)

40. LAUERSEN, F.: Z. Lebensmittelunters. und -Forsch. 96, 418 (1953)

41. LOHMANN, K. und P. LANGEN: Biochem. Z. 328, 1 (1956)

42. MANN, T.: Biochem. J. 38, 339 (1944)

43. MALMGREN, H. und B. INGELMANN: Acta chem. scand. 1, 422 (1947)

44. MATTENHEIMER, H.: Naturwiss. 40, 530 (1953)

45. MATTENHEIMER, H.: Biochem. Z. 322, 36 (1951)

46. MATTENHEIMER, H.: Z. physiol. Chem. 303, 107 (1956)

47. MORGULIS, J.: J. Biol. Chem. 93, 455 (1931)

48. RUSKA, H., G. BRINGSMANN, J. NECKEL und G. SCHUSTER: Z. wiss. Mikrosk. 60, 425 (1952)

49. SALVESEN, H.: J. biol. Chem. 60, 311 (1924)

50. SCHREIER, K. und H. G. NÖLLER: Arch. exper. Path. und Pharmakol. 227, 199 (1955)

51. SCHWIETZER, C. H.: Biochem. Z. 328, 35 (1956)

52. STICH, H.: Z. Naturforsch. 8 b, 36 (1953)

53. THILO, E.: Angew. Chem. 67, 141 (1955)

54. WEBER, E.: "Grundriß d. biol. Statistik" Jena: Fischer-Verlag 1948

55. ZIPF, K. Arneimittel-Forschung 7, 445 (1957)

Herrn Professor Dr. h.c. K. Zipf bin ich für das Überlassen des Themas, sowie für die vorzüglichen Arbeitsbedingungen am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. A. Schmid danke ich für die mir jederzeit gewährte Unterstützung recht herzlich.

LEBENSLAUF

Ich, Heinz Dieter Müssigmann, bin am 6. Februar 1937 in Alpirsbach / Kreis Freudenstadt (Württ.), als Sohn des Gottfried Müssigmann, Landwirt und Frida geborene Schnell, geboren.
Meine Eltern wohnen in Peterzell Krs. Rottweil (Württ.), wo ich auch meine Kindheit verbrachte.

Nach dem Besuch von 4 Jahren Grundschule ging ich 1948 in die Oberschule in Alpirsbach, die ich bis zum Einjährigen durchlief. Nach Abschluß trat ich in das Gymnasium in Schramberg /Krs. Rottweil ein, wo ich im Februar 1957 die Reifeprüfung mit Erfolg ablegte.

Im Sommer-Semester 1957 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München mit dem Studium der Veterinärmedizin, das ich im Januar 1962 mit dem Staatsexamen abgeschlossen habe.